Kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra®

REF 080-005

Usage prévu

Le kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra® est destiné à l'isolement et à la purification de l'ADN fongique présent chez l'homme dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA), les expectorations et d'autres échantillons des voies respiratoires inférieures.

Résumé et explication

Ce kit est destiné à l'isolement d'ADN d'origine fongique dans les échantillons des voies respiratoires inférieures humaines prélevés sur des patients suspects de mycose. L'extraction d'ADN fongique est une première étape décisive de l'analyse d'un échantillon à la recherche d'ADN fongique spécifique. Étant donnée la difficulté à rompre les parois fongiques, différents procédés doivent être mis en œuvre pour optimiser le rendement : application de forces mécaniques directes dans un tampon suivie de plusieurs étapes de purification afin d'éliminer les substances inhibitrices de la PCR, les composants de la paroi cellulaire et de la matrice humaine puis élution dans un tampon. La qualité de l'ADN purifié convient à une analyse par PCR en temps réel.

Principes de la méthode

Les spores et les hyphes fongiques présents dans l'échantillon sont concentrés par centrifugation puis remis en suspension dans un faible volume. L'échantillon est alors versé dans un tube contenant des billes d'agitation, la solution de lyse, la solution pour billes d'agitation et la solution d'élimination des inhibiteurs (IRS). Le principe repose sur la lyse des microorganismes de l'échantillon par l'action combinée de détergent et de force mécanique contre les billes spéciales. Les composants cellulaires sont lysés par l'action mécanique d'un Vortex. À partir des cellules lysées, l'ADN libéré se lie à un filtre à centrifuger en silice. Le filtre est lavé et l'ADN récupéré dans une solution tampon. L'ADN est alors prêt pour l'analyse par PCR.

Contenu du kit

- Quantité suffisante pour 10 échantillons de patient

Description	Volume (mL)
10 tubes de 2 mL de solution pour billes d'agitation	0,55
Solution S1	0,65
Solution IRS	2,2
Solution S2	2,75
Solution S3	14,5
Solution S4	3,3
Solution S5	1,1

- 10 filtres à centrifuger dans des tubes de 2 mL
- 40 tubes à microcentrifugation (2 mL)
- Mode d'emploi

Conservation

Il convient de conserver le kit à température ambiante (de 15 à 30 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit, date au-delà de laquelle il convient de mettre le kit au rebut conformément à la réglementation locale en vigueur.

Mises en garde et précautions

L'utilisation du kit est réservée aux professionnels de laboratoire. Des pratiques, des modes opératoires, des équipements et des installations de confinement de niveau de biosécurité 2 sont exigés pour éviter la production d'aérosols lors de la manipulation des échantillons cliniques. Toutes les activités produisant des aérosols doivent être réalisées dans une enceinte biologique de sécurité de classe II ou III. Les échantillons cliniques peuvent contenir des

microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine. Il convient d'observer les précautions habituelles et les recommandations en vigueur dans l'établissement lors de la manipulation de tout élément contaminé par du sang ou d'autres liquides organiques. Le kit contient des petites quantités de : éthanol, dodécyl sulfate de sodium, chlorhydrate de guanidine et isothiocyanate de guanidine. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible auprès de Myconostica Ltd.

Équipement nécessaire

- Microcentrifugeuse (10 000 g)
- Centrifugeuse à usage général
- Micropipettes à embouts filtres stériles (volumes de 40 µL à 1 000 µL)
- Agitateur Vortex Genie 2 (Scientific Industries, disponible auprès des fournisseurs locaux)
- Adaptateur Vortex (disponible auprès de Myconostica, RÉF. 080-015) pour fixer les tubes à l'agitateur

Remarques sur le mode opératoire

La durée du mode opératoire est d'environ 1,5 heures. Si l'échantillon est constitué d'expectorations ou qu'il s'agit d'un échantillon de LBA visqueux, un prétraitement supplémentaire est nécessaire, comme indiqué dans le mode opératoire ci-dessous pour les expectorations et autres échantillons respiratoires visqueux.

Lire le protocole dans son intégralité avant de commencer. Toujours porter des gants. Pendant les étapes d'agitation au Vortex, tous les tubes doivent être bouchés. Transvaser les liquides au moyen de micropipettes. En cas de traitement d'échantillons de plusieurs patients, veiller à identifier les tubes de manière adaptée.

Mode opératoire pour des échantillons de LBA transparents et fluides

Remarque : S'il est prévu de soumettre l'ADN extrait à un test Myconostica MycAssay™, il est recommandé d'utiliser un volume initial d'échantillon de LBA ≥ 2 ml.

1. Centrifuger l'échantillon de LBA pendant 20 mn à 3 000 *g*. Décanter et conserver le surnageant.
2. Remettre 800 µL de surnageant au culot de centrifugation, remettre en suspension et transvaser dans un tube à microcentrifugation (fourni).
3. Centrifuger pendant 2 mn à 10 000 *g* puis retirer la totalité du surnageant. Remettre en suspension le culot dans la solution restante dans le tube puis transvaser l'ensemble dans un tube de solution pour billes d'agitation de 2 mL.
4. Retourner doucement le tube pour mélanger.
5. **Contrôler la solution S1.** Si la solution S1 a précipité, chauffer le tube dans la main et mélanger au vortex pour dissoudre le précipité.
6. Ajouter 60 µL de solution S1 dans le tube de solution pour billes d'agitation et retourner le tube plusieurs fois ou agiter brièvement au Vortex.
7. Ajouter 200 µL de solution IRS dans le tube de solution pour billes d'agitation.
8. Fixer le(s) tube(s) contenant les billes à l'horizontale sur un adaptateur Vortex adéquat (disponible auprès de Myconostica, RÉF. 080-015). Agiter au Vortex à vitesse maximale pendant 10 mn.
9. Centrifuger le(s) tube(s) de solution pour billes d'agitation à 10 000 *g* pendant 30 s. **PRUDENCE :** Veiller à ne pas dépasser 10 000 *g*, au risque de briser les tubes. S'assurer que les tubes de 2 mL tournent librement dans la centrifugeuse, sans frotter.
10. Transvaser 450 µL du surnageant dans un tube à microcentrifugation propre (fourni) en veillant à ne pas verser les billes d'agitation. Jeter le tube de solution pour billes d'agitation.
11. Ajouter 250 µL de solution S2 au surnageant et agiter au Vortex pendant 5 s. Incuber entre 4 et 8 °C pendant 5 mn.
12. Centrifuger les tubes pendant 1 mn à 10 000 *g*.
13. En évitant le culot, transvaser la totalité du volume du surnageant dans un tube à microcentrifugation propre (fourni).
14. Ajouter 1,1 mL (2 X 550 µL) de solution S3 au surnageant (faire preuve de prudence car le tube est presque plein). Mélanger en retournant le tube.
15. Charger environ 650 µL sur un filtre à centrifuger et centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s. Jeter ce qui s'est écoulé du filtre, verser à nouveau 650 µL de surnageant sur le filtre à centrifuger et centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s. Répéter jusqu'à ce que tout le surnageant soit passé dans le filtre. **Remarque** : Au total, trois charges sont nécessaires par échantillon. Après le dernier ajout, centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 mn. Jeter ce qui s'est écoulé du filtre.
16. Ajouter 300 µL de solution S4 sur le filtre à centrifuger et centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s.
17. Jeter ce qui s'est écoulé du filtre.
18. Centrifuger à nouveau pendant 1 mn pour éliminer les dernières traces de S4 qui inhibe la PCR.
19. Placer avec précaution le filtre à centrifuger dans un tube à microcentrifugation propre (fourni). Éviter de transporter de la solution S4 sur le filtre.
20. Ajouter avec précaution 40 µL de solution S5 au centre de la membrane filtrante à centrifuger blanche. Laisser à température ambiante pendant 2 mn.

21. Centrifuger à 10 000 g pendant 30 s.
22. Jeter le filtre à centrifuger. L'ADN présent dans le tube est alors prêt pour la PCR. Conserver entre 2 et 8 °C pendant 5 jours ou congeler à -20 °C.
23. Le kit permet de traiter jusqu'à 10 échantillons de LBA. Si l'ensemble des composants n'est pas utilisé en une seule fois, replacer ce qui reste dans l'emballage d'origine. Ne pas mélanger les lots.
24. Une fois le traitement terminé, il convient de mettre au rebut les composants usagés conformément aux règles d'hygiène, de sécurité et environnementales.

Mode opératoire pour les expectorations et autres échantillons respiratoires visqueux

Pour la préparation des échantillons d'expectorations, il est recommandé d'utiliser le kit de digestion/décontamination d'échantillons mycobactériens BD BBL™ MycoPrep™ (réf. catalogue 240862) conjointement au mode opératoire MycXtra®. Le mode opératoire ci-dessous a été adapté aux exigences de préparation des échantillons du kit MycXtra®.

Précautions

Le réactif NALC-NaOH du kit de digestion/décontamination d'échantillons mycobactériens BD BBL™ MycoPrep™ contient une base forte et peut provoquer de graves brûlures. Enlever immédiatement tout vêtement contaminé. Il est impératif de porter des gants ainsi que des équipements de protection des yeux et du visage. Le NaOH est un réactif irritant pour les yeux et la peau. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement avec une douche oculaire ou de l'eau du robinet pendant au moins 15 mn puis consulter un médecin. En cas d'ingestion, boire du lait, du blanc d'œuf ou une grande quantité d'eau et consulter un médecin.
Prudence : Casser l'ampoule près de son centre en une seule fois. Ne pas manipuler l'ampoule une fois cassée car le flacon en plastique peut se percer et risque de provoquer des blessures.
Consignes de conservation : À la livraison, conserver entre 15 et 30 °C. Ne pas congeler. Ne pas ouvrir avant d'être sur le point d'utiliser le kit.
Détérioration du produit : Ne pas utiliser les réactifs si les ampoules sont cassées ou présentent des signes visibles de détérioration. Ne pas utiliser le tampon phosphate si l'emballage est déchiré ou ouvert.

Mode opératoire

1. Préparer la solution tampon phosphate du kit BBL™ MycoPrep™. Verser le contenu d'un sachet de tampon phosphate dans une fiole en verre à bouchon à vis et compléter au trait de 500 mL avec de l'eau de qualité biologie moléculaire. Stériliser, bouchon desserré, dans un autoclave à 121 °C pendant 15 mn. Laisser refroidir à température ambiante et visser le bouchon.
2. Desserrer avec précaution le bouchon à vis du flacon de réactif BBL™ MycoPrep™. Repérer l'ampoule dans le flacon, presser le flacon pour en chasser l'air et visser le bouchon. Le flacon étant à la verticale, le presser jusqu'à casser l'ampoule. Agiter doucement pour dissoudre la NALC. Éviter toute agitation excessive. UNE FOIS L'AMPOULE CASSÉE, UTILISER LE RÉACTIF SOUS 24 H.
3. Dans une enceinte biologique de sécurité (de classe 2 au minimum), dans un tube à centrifuger gradué de 50 mL à bouchon à vis, verser l'échantillon, en estimer le volume et ajouter deux volumes de la solution activée de NALC-NaOH. Exemple : Ajouter 4 mL de solution activée de NALC-NaOH à environ 2 mL d'échantillon.
4. Boucher le tube à centrifuger et agiter au Vortex jusqu'à solubilisation de l'échantillon. Si l'échantillon est particulièrement visqueux, ajouter de la solution de NALC-NaOH et répéter l'agitation.
5. Laisser reposer le mélange à température ambiante pendant 15 mn en agitant doucement de temps en temps.
6. Ajouter le tampon phosphate préparé jusqu'au trait des 35 mL du tube à centrifuger et agiter. Centrifuger pendant 20 mn à 3 000 *g*.
7. Décanter avec précaution la totalité du liquide surnageant. À l'aide d'une micropipette, prélever doucement tout surnageant qui n'a pas été décanté.
8. Ajouter 800 µL de tampon phosphate préparé et remettre le dépôt en suspension. Transvaser la totalité du mélange dans un tube à microcentrifugation.
9. Suivre le mode opératoire pour le LBA à partir de l'étape 3.

Caractéristiques de performance et limites

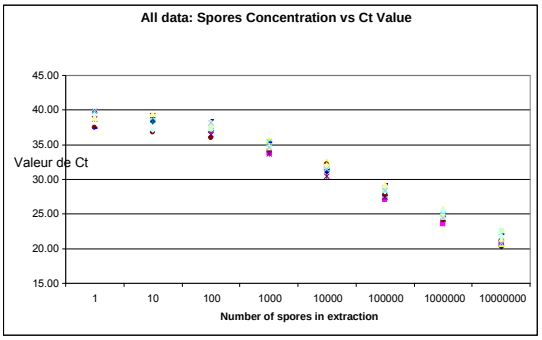
Sélectivité analytique

À l'aide d'un kit MycXtra®, l'ADN a été extrait d'échantillons cliniques de LBA, d'expectorations et d'autres liquides respiratoires dans lesquels les organismes suivants ont été identifiés par culture ou microscopie : *Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus flavus, Pénicillium spp. et Pneumocystis jirovecii*. L'ADN a été détecté à l'aide du kit Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) pour détection rapide par PCR en temps réel de l'ADN d'*Aspergillus* et de *Pneumocystis* dans des échantillons respiratoires cliniques.

Élimination des substances interférentes

Les médicaments couramment utilisés pour le traitement des maladies respiratoires tels que la tobramycine, le colistine sulfate, la dornase (DNAse), le salmétérol et d'autres substances telles que le sérum physiologique (0,9 %), l'héparine et l'acide tannique sont susceptibles d'inhiber la PCR en temps réel. Le procédé d'extraction du MycXtra® permet de les éliminer complètement. Les essais d'évaluation des performances à l'aide d'échantillons cliniques ont indiqué la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les échantillons respiratoires, dont la nature n'est pas élucidée et qui ne sont pas éliminés par le procédé d'extraction.

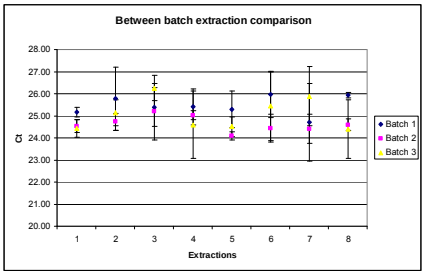
Seuil de détection et répétabilité



Le kit MycXtra® a permis d'extraire l'ADN d'échantillons ne contenant que 10 spores. Les extractions de spores d'*Aspergillus fumigatus* dans le sérum physiologique ont été réalisées par 2 techniciens sur 5 jours. L'ADN a été détecté avec le kit Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) dont le seuil de détection est d'environ 1 génome d'*A. fumigatus*. Les résultats sont présentés sur la Figure 1. Le coefficient de variation total a été calculé à 2,4 %. Il a été déterminé que l'efficacité moyenne d'extraction était de 8 %.

Figure 1. Concentration des spores d'*Aspergillus fumigatus* en fonction de la valeur de Ct de la PCR en temps réel

Reproductibilité



Vingt-quatre extractions individuelles ont été réalisées, chacune avec trois lots de kits MycXtra®, sur une suspension de spores d'*Aspergillus fumigatus* normalisée. Une PCR en temps réel, à l'aide du kit Myconostica FXG™ : RESP (Asp +), a ensuite été réalisée pour déterminer la variabilité inter- et intra-lots de l'extraction d'ADN d'*Aspergillus fumigatus*. Les résultats sont présentés sur la Figure 2.

Figure 2. Variabilité inter- et intra-lots de l'extraction

Évaluation des performances

Détection de l'espèce *Aspergillus*

Des échantillons respiratoires (LBA) prélevés dans deux hôpitaux, dont l'ADN a été extrait avec le kit MycXtra® puis qui ont été congelés, ont servi à évaluer les performances du kit MycAssay™ Aspergillus avec les échantillons cliniques. Les résultats ont été comparés au diagnostic clinique.

La valeur limite de Ct = 36,0 a été déterminée suite au passage en revue d'un ensemble de données d'échantillons issus de différents sites et prélevés sur différentes populations de patients. La probabilité de différenciation entre la maladie et l'état sain a été évaluée avec plusieurs valeurs limites.

Comparaison entre la PCR et le diagnostic clinique

	Diagnostic clinique positif	Diagnostic clinique négatif		
PCR positive	31	1	0,97	VPP
PCR négative	2	10	0,83	VPN
	0,94	0,91		
	Sensibilité	Spécificité		

Parmi les échantillons analysés, 0,8 % contiennent des inhibiteurs de la PCR suite à l'extraction à l'aide du kit MycXtra®, comme indiqué par le contrôle interne d'amplification.

Détection de *Pneumocystis jirovecii*
Des échantillons cliniques prélevés par LBA dans deux hôpitaux, dont l'ADN a été extrait avec le kit MycXtra® puis qui ont été congelés, ont servi à évaluer les performances du kit MycAssay™ Pneumocystis. Les résultats obtenus par PCR ont été comparés à ceux obtenus par immunofluorescence.

Comparaison entre la PCR et le diagnostic microscopique

	Microscopie positive	Microscopie négative		
PCR positive	45	8	0,85	VPP
PCR négative	2	33	0,94	VPN
	0,96	0,80		
	Sensibilité	Spécificité		

Le tableau présente des données obtenues pour des patients infectés par le VIH, des patients non infectés par le VIH et des patients dont l'infection par le VIH est indéterminée. Chez les patients atteints de pneumonie à *Pneumocystis*, la quantité d'organismes détectables est très variable. Plus la valeur de Ct est faible, plus la probabilité de la maladie est élevée. Le nombre d'organismes détectables tend à être plus élevé chez les patients infectés par le HIV qui souffrent de pneumonie à *Pneumocystis* que chez les patients non infectés par le virus, bien que ces deux catégories présentent un chevauchement considérable. Ce chevauchement est visible sur le diagramme de dispersion de la Figure 3 ci-dessous. Pour des résultats complets, dans la mesure où le jeu de données du tableau inclut des patients dont l'infection par le VIH est indéterminée, le diagramme de dispersion de ce groupe est donné à la colonne 3 de la Figure 3 :

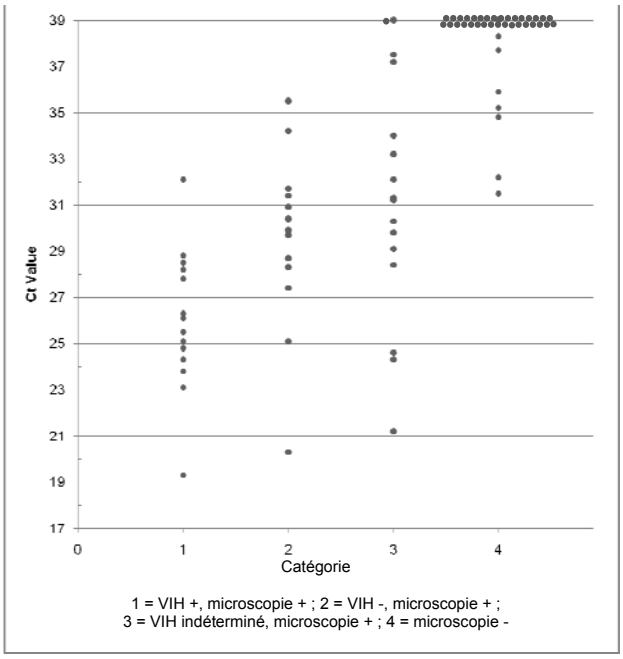


Figure 3 : Diagramme de dispersion des valeurs de Ct obtenues à partir d'ADN extrait d'échantillons respiratoires de patients. Quatre groupes sont décrits.

Myconostica Limited, South Court, Sharston Road, Sharston, Manchester,
M22 4SN, Royaume-Uni.
Téléphone : +44 (0) 161 998 7239 Fax : +44 (0) 161 902 2496
Courriel : mycotech@myconostica.co.uk

IVD